

基于 *gyrB* 基因的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测病原灿烂弧菌

于永翔^{1,2} 王印庚² 刘智超^{1,2} 廖梅杰^{2*} 张正² 荣小军² 李彬² 战文斌¹

(¹ 中国海洋大学水产学院, 青岛 266100)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 是多数海水养殖动物的主要致病菌, 对养殖业危害较大。本研究根据灿烂弧菌 *gyrB* 基因的保守序列设计特异性引物, 建立了 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测灿烂弧菌的方法。构建含 *gyrB* 基因的重组质粒作为标准品, 进行 SYBR Green I 实时定量 PCR, 在 T_m 为 62℃ 时, 扩增产物的熔解曲线仅有一个单特异峰, 扩增所得标准曲线为 $y = -3.338x + 37.67$, 相关系数为 0.999, 扩增效率为 0.99, 最低能检测到 20 个拷贝。实验结果表明, 该检测技术具有较高的特异性、敏感性和重复性, 对灿烂弧菌病的快速诊断和流行病学调查有重要意义。

关键词 *gyrB* 基因; 灿烂弧菌; 实时定量 PCR; SYBR Green I

中图分类号 S963.7 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)03-0134-09

Development of a real-time PCR method for the detection of *Vibrio splendidus* based on *gyrB* gene

YU Yong-xiang^{1,2} WANG Yin-geng² LIU Zhi-chao^{1,2} LIAO Mei-jie^{2*}

ZHANG Zheng² RONG Xiao-jun² LI Bin² ZHAN Wen-bin¹

(¹ College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266100)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture;

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT *Vibrio splendidus* is a deleterious pathogenic bacterium for most marine animals, and it causes great losses in aquaculture industry. To develop a quantitative detection method of *V. splendidus* is important because its pathogenicity is closely related to the population density. To develop a rapid SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method, a pair of specific primers were designed according to *V. splendidus gyrB* gene to determine the specificity and sensitivity. The real-time PCR amplification conditions were optimized. Recombinant plasmid containing *gyrB* gene of *V. splendidus* was constructed and used to establish the standard curve. The detection limit and reproducibility were calculated. A 251 bp fragment was amplified from chromosomal DNA, but no positive reaction was detected in 9 other bacteria species using conventional PCR, which indicated that the primer pair has good intra-species specificity and inter-species commonality. The standard curve was

十二五 863 项目(2012AA10A412-4)、科研院所技术开发研究专项项目(2011EG34219)、国家科技支撑计划课题(2012BAD17B03)、国家自然科学基金项目(30901120;31202016)和青岛市战略性新兴产业培育计划项目(13-4-1-65-hy)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85817991

收稿日期: 2013-05-04; 接受日期: 2013-07-30

作者简介: 于永翔(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产疾病控制相关研究。E-mail: shengjiuyongxiang@126.com

$y = -3.338x + 37.67$; the correlation coefficient was 0.999 and the amplification efficiency was 0.99, indicating a good linear relationship between initial templates and C_T values. The melting curve had only one specific peak when annealing temperature was 62°C. The detection limit of the assay was 20 copies per reaction. The results indicated that the established SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method for *V. splendidus* had high specificity, sensitivity and repeatability, which may help *V. splendidus* diagnosis and epidemiology.

KEY WORDS *gyrB* gene; *Vibrio splendidus*; Real-time quantitative PCR; SYBR Green I

灿烂弧菌 *Vibrio splendidus* 广泛存在于海洋环境,属革兰氏阴性菌,杆状,可运动,有极生单鞭毛,分生物 I 型和生物 II 型,二者均有致病性,是海洋动物重要致病菌之一(王印庚等 2013)。有关灿烂弧菌的研究已有许多报道(Gatesoupe *et al.* 1999;Farto *et al.* 1999;莫照兰等 2003)。灿烂弧菌作为致病菌,对水生动物包括鱼类、双壳贝类、甲壳类和棘皮动物等的养殖造成了巨大的损失,还可作为致病微生物之一,与病毒等同时致使双壳贝类等发病。因此,为了满足水产养殖生产对该菌快速诊断的要求,选择合适的分子靶标,开发灵敏度高、特异性强的灿烂弧菌快速检测方法具有重要的现实意义。

传统的灿烂弧菌检测方法需经富集培养、形态特征观察、革兰氏染色、生理生化反应、血清学鉴定等一系列过程,耗时长且效率不高。随着分子生物学技术的发展,应用免疫方法建立的直接凝集法、双抗原夹心 ELISA 法、Dot-ELISA、间接荧光抗体技术等(谢建军等 2007)和基于普通 PCR 技术为依托的原位杂交、斑点杂交等方法已多有报道(王印庚等 2009;张凤萍等 2008),为灿烂弧菌的快速定性诊断提供了技术依据。相关研究表明,水产疾病的发生不仅与致病原的种类有关,还与环境和机体内致病菌的密度密切相关(李亚晨等 2004)。因此,建立灿烂弧菌定量检测方法对灿烂弧菌所引发疾病的防控具有重要的现实意义。荧光定量 PCR 克服了普通 PCR 只能定性不能定量的缺点,应用领域更为广泛。SYBR Green I 进行实时定量的原理是其荧光信号强度与双链 DNA 的数量相关,可以根据荧光信号检测出 PCR 体系中存在的双链 DNA 数量。黄世旺等(2006)利用荧光定量探针法定量检测霍乱弧菌,最低能检测到 10 CFU/ml;覃倚莹等(2008)同样利用荧光定量探针法快速检测副溶血弧菌,检测灵敏度可到 25 个拷贝;Zhou 等(2007)利用荧光定量染料法快速检测溶藻弧菌。荧光定量 PCR 还可以与多重 PCR 结合使用,达到定量检测多种细菌或者同一菌种中不同菌株的目的(石晓路等 2006;彭雁忠等 2005;Nordstrom *et al.* 2007)。虽然荧光定量 PCR 在病原菌快速检测中应用越来越多,但是鲜有对灿烂弧菌的荧光定量检测的文章和报道。本研究是在上述研究基础上,以 *gyrB* 基因为靶基因,建立了 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测灿烂弧菌的方法,为建立特异性强、灵敏度高的定量检测技术提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及其来源

实验用菌种包括哈维氏弧菌 *V. harveyi*、鳗弧菌 *V. anguillarum*、灿烂弧菌 *V. splendidus*、迟缓爱德华菌 *Edwardsiella tarda*、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*、溶藻弧菌 *V. alginolyticus*、大菱鲆弧菌 *V. scophtalmi*、费氏弧菌 *V. fischeri*、大肠杆菌 *Escherichia coli* 等 9 种,共 12 株。各菌株的编号和来源见表 1,其中 VHBZ 0001、VABZ 0002、VABZ0007、VSBZ 0003、VPBZ 0004、VABZ 0005 为购自中国科学院微生物研究所的标准菌株,其余菌株为本实验室分离保存的水产疾病病原株。

1.2 *gyrB* 基因克隆及引物设计

将表 1 中的菌株活化,利用北京 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌体的基因组 DNA,分光光度计测定基因组 DNA 的浓度并定量至约 100 ng/ μ l。根据 *gyrB* 基因通用引物(Yamamoto *et al.* 1995)扩增哈

维氏弧菌(VHBZ 0001)、鳗弧菌(VABZ 0002)、灿烂弧菌(VSBZ 0003)、迟缓爱德华菌(Sm05091301A)、副溶血弧菌(VPBZ 0004)、溶藻弧菌(VABZ 0005) *gyrB* 基因的部分序列。对扩增所得到的条带进行切胶回收、连接、转化等实验,构建重组质粒,测序获得6种弧菌的 *gyrB* 基因序列,所得的基因序列组成提交NCBI数据库,登录号分别为JQ698506、JQ698507、JQ698508、JQ698509、JQ698510、JQ698511。利用软件ClustalW(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)进行同源性分析,根据比对结果确定在灿烂弧菌菌株内保守、在其他菌株之间特异的区段,利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物Vs-F和Vs-R。

表1 实验用菌株及其来源

Table 1 Name and resource of bacterial strains used in this study

菌株 Strain	拉丁名 Latin name	编号 ID	来源 Resource
哈维氏弧菌	<i>V. harveyi</i>	VHBZ 0001	中国科学院微生物研究所
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	VABZ 0002	中国科学院微生物研究所
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	VABZ0007	中国科学院微生物研究所
灿烂弧菌	<i>V. splendidus</i>	VSBZ 0003	中国科学院微生物研究所
灿烂弧菌	<i>V. splendidus</i>	Sm03051201A	实验室分离
灿烂弧菌	<i>V. splendidus</i>	Lj09121801B	实验室分离
迟缓爱德华菌	<i>E. tarda</i>	Sm05091301A	实验室分离
副溶血弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>	VPBZ 0004	中国科学院微生物研究所
溶藻弧菌	<i>V. alginolyticus</i>	VABZ 0005	中国科学院微生物研究所
大菱鲆弧菌	<i>V. scophtalmi</i>	Sm02112702A	实验室分离
费氏弧菌	<i>V. fischeri</i>	Sm02112702A	中国科学院微生物研究所
大肠杆菌	<i>E. coli</i>	Trans1-T1	北京全式金生物技术有限公司

1.3 引物特异性检测

以Vs-F和Vs-R为引物,分别以哈维氏弧菌(VHBZ 0001)、鳗弧菌(VABZ 0002)、鳗弧菌(VABZ0007)、灿烂弧菌(VSBZ 0003)、迟缓爱德华菌(Sm05091301A)、副溶血弧菌(VPBZ 0004)、溶藻弧菌(VABZ 0005)、大菱鲆弧菌(Sm02112702A)、费氏弧菌(Sm02112702A)、大肠杆菌(Trans1-T1)的基因组DNA为模板进行常规PCR扩增,验证本灿烂弧菌引物的特异性。PCR反应体系为:超纯水18.5 μl,10×PCR buffer 2.5 μl,dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μl,10 μmol/L的引物各0.5 μl,DNA模板(约100 ng/μl)1 μl,TaKaRa *rTaq*(5 U/μl)0.2 μl;PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,59℃复性30 s,72℃延伸40 s,共30个循环,最后72℃延伸10 min。电泳检测所设计引物在不同菌种之间的特异性。

1.4 引物通用性检测

以不同来源的3株灿烂弧菌(VSBZ0003、Sm03051201A、Lj09121801B)基因组DNA为模板,以所设计的Vs-F和Vs-R为引物进行常规PCR扩增,PCR体系和程序与引物特异性检测时相同,电泳检测所设计引物在灿烂弧菌不同株(系)之间的通用性。

1.5 荧光定量PCR扩增条件优化

设立引物终浓度梯度为0.2–1.0 μmol/L,以确定反应的最佳引物浓度;设立温度梯度为59–62℃,根据PCR扩增结果,选取最佳退火温度。

1.6 灿烂弧菌SYBR Green I荧光RT-PCR检测方法的建立

1.6.1 标准品的构建

选取1.2中所得到的灿烂弧菌阳性克隆进行质粒提取,用核酸蛋白分析仪测定质粒浓度,利用下述公式计算出每μl质粒中的DNA拷贝数,将该质粒作为标准品。

$$\text{质粒拷贝数(copies/}\mu\text{l)} = \frac{\text{浓度}(\text{ng}/\mu\text{l}) \times 6 \times 10^{14}}{M \times X}$$

其中 M 表示每个碱基的平均分子量, X 表示重组质粒大小。

1.6.2 标准曲线的构建及其重复性

以构建好的 pMD18-*gyrB* 重组质粒作为灿烂弧菌定量标准品,用 EASY Dilution 对定量标准品进行 10 倍梯度稀释,共稀释 9 个梯度,每个梯度做 3 个重复,利用优化好的 PCR 反应条件,进行荧光定量反应,建立质粒起始浓度与循环阈值 C_T 对应关系的标准曲线。分析标准曲线的相关系数和扩增效率,判断标准曲线的优劣。

标准曲线的重复性检测分为组内重复性实验和组间重复性实验两部分。选取构建好的 pMD18-*gyrB* 重组质粒,稀释 5 个梯度,组内重复性实验设 3 个重复管,主要考察在同一次试验中 3 个重复间的均一性,用均值和方差来分析,计算其组内变异系数;组间重复性实验主要考察样品在不同批次的实验、不同的储存时间对标准品稳定性的影响。把标准品放于 -20°C ,分别在 1、20、40 d 时取出,作标准曲线,用 Excel 对 C_T 值进行方差分析,用 F 检验进行显著性检验。

1.7 荧光定量 PCR 与普通 PCR 的敏感性比较实验

取不同浓度梯度灿烂弧菌的标准品 $1 \mu\text{l}$ 作为普通 PCR 的模板,用所设计的引物进行普通 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖电泳,观察并判读实验结果,确定普通 PCR 的检测灵敏度,比较荧光定量 PCR 与普通 PCR 的敏感性。

2 结果

2.1 引物设计结果

将不同菌株的 *gyrB* 基因克隆测序的结果进行同源性分析(图 1),选取灿烂弧菌特异性序列区域设计引物 $V_s\text{-F}$ 和 $V_s\text{-R}$,具体引物序列为:上游引物 $V_s\text{-F}$: $5'\text{-AGTGAAATCTGCCGTTGAACAA}\text{-}3'$,下游引物 $V_s\text{-R}$: $5'\text{-CCGAGTCACCCTCCACTATGT}\text{-}3'$,扩增片段大小为 251 bp。

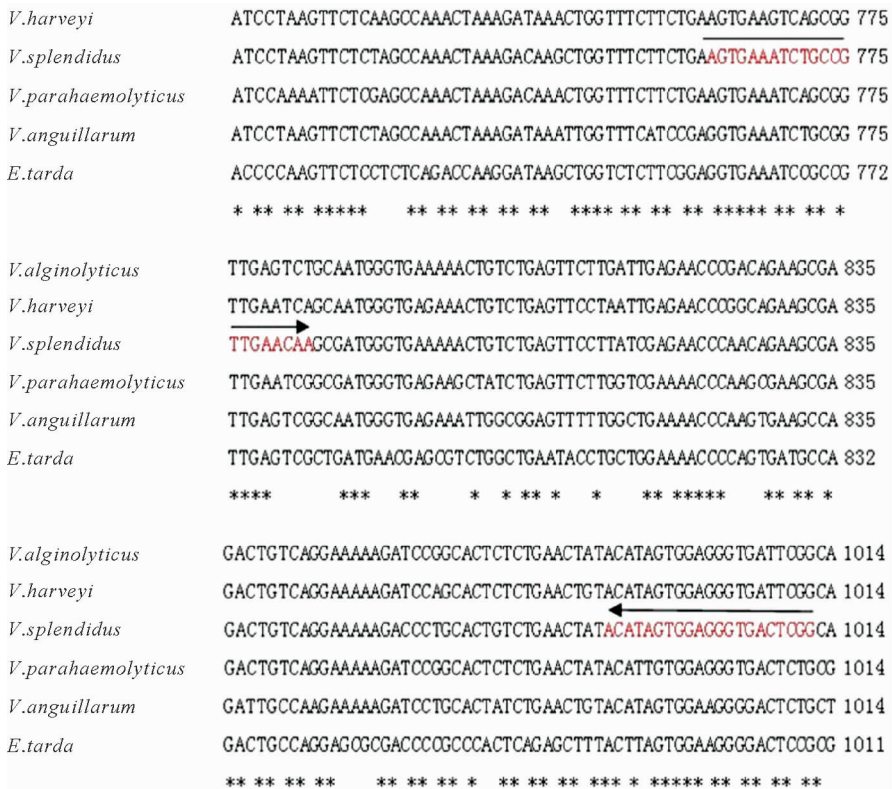


图 1 *gyrB* 基因比对结果及灿烂弧菌 *gyrB* 基因引物设计

Fig. 1 The blasting results of *gyrB* gene sequences and the design of *V. splendidusgyrB* gene primers (upper line)

2.2 引物特异性及通用性检测结果

以灿烂弧菌的 (Vs-F/Vs-R) 为引物, 对哈维氏弧菌 (VHBZ 0001)、鳗弧菌 (VABZ 0002)、鳗弧菌 (VABZ0007)、灿烂弧菌 (VSBZ 0003)、迟缓爱德华菌 (Sm05091301A)、副溶血弧菌 (VPBZ 0004)、溶藻弧菌 (VABZ 0005)、大菱鲂弧菌 (Sm02112702A)、费氏弧菌 (Sm02112702A)、大肠杆菌 (Trans1-T1) 模板 DNA 进行常规 PCR 扩增, 由电泳检测结果 (图 2) 可知, 仅灿烂弧菌扩增出大小约为 250 bp 的目的基因片段, 而其他 9 株非灿烂弧菌均没有扩增产物, 为阴性结果, 说明该实验所设计的引物具有很强的种间特异性。

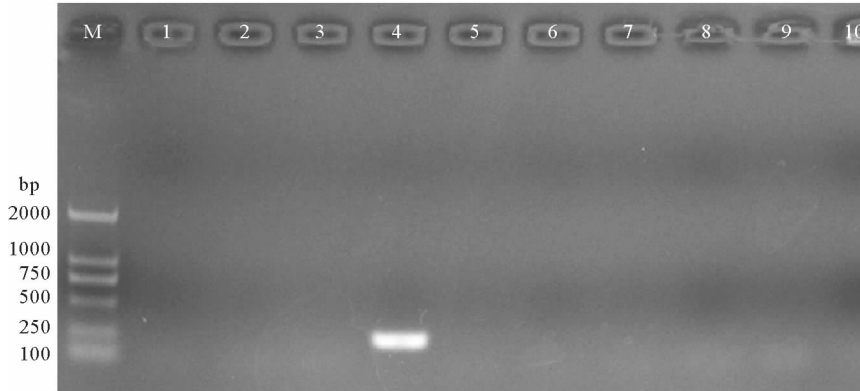


图 2 引物的特异性检测结果

Fig. 2 Specific detection of primers

M. DL2000; 1. 哈维氏弧菌; 2. 鳗弧菌; 3. 鳗弧菌; 4. 灿烂弧菌; 5. 迟缓爱德华菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 溶藻弧菌; 8. 大菱鲂弧菌; 9. 费氏弧菌; 10. 大肠杆菌
M. DL2000; 1. *V. harveyi*; 2. *V. anguillarum*; 3. *V. anguillarum*; 4. *V. splendidus*; 5. *E. tarda*; 6. *V. parahaemolyticus*; 7. *V. alginolyticus*; 8. *V. o. scopthalmi*; 9. *V. fischeri*; 10. *E. coli*

以灿烂弧菌的 (Vs-F/Vs-R) 为引物, 对分离自海参和大菱鲂的灿烂弧菌菌株以及购自中国科学院微生物研究所的灿烂弧菌标准菌株模板 DNA 进行常规 PCR 扩增, 由电泳检测结果 (图 3) 可知, 3 株灿烂弧菌均能扩增出大小约为 250 bp 的目的基因片段, 说明该实验所设计的引物具有很强的种内通用性。

2.3 荧光定量扩增条件优化

经过实验优化, 确定进行实时定量 PCR 扩增体系中引物终浓度为 $0.25 \mu\text{mol/L}$, 即 $20 \mu\text{l}$ 的荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq II ($2 \times$) $10 \mu\text{l}$, Vs-F ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.5 \mu\text{l}$, Vs-R ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.5 \mu\text{l}$, DNA 模板 $1 \mu\text{l}$, 补超纯水至 $20 \mu\text{l}$ 。

对退火温度进行优化, 结果见图 4。由图 4 可知, 62°C 为最适退火温度, 此时扩增效率和引物特异性最佳。荧光定量 PCR 反应条件为: 95°C 30 s; 95°C 10 s, 62°C 20 s, 72°C 20 s, 40 个循环; 熔解曲线分析 (Eppendorf 默认程序): 95°C 15 s, 60°C 15 s, 95°C 15 s, 此过程不断收

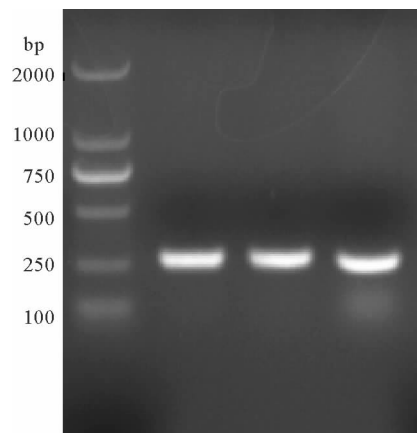


图 3 引物的通用性检测

Fig. 3 Examination of the primers universal detection

M. DL2000; 1. 灿烂弧菌 (Sm03051201A); 2. 灿烂弧菌 (Lj09121801B); 3. 灿烂弧菌标准菌株 (VSBZ 0003)
M. DL2000; 1. *V. splendidus* (Sm03051201A); 2. *V. splendidus* (Lj09121801B); 3. standard *V. splendidus* (VSBZ 0003)

集荧光信号,形成熔解曲线。

2.4 标准品的构建

含有灿烂弧菌 *gyrB* 基因的重组质粒 pMD18-*gyrB* 经分光光度计测定,其浓度为 64.2 ng/μl,载体碱基数为 2692 bp,目的片段碱基数为 251 bp,然后利用公式换算出拷贝数为 2×10^{10} copies/μl,将该重组质粒稀释成 2×10^9 copies/μl 后作为定量标准品原液保存。

2.5 标准曲线的构建及其重复性

利用优化好的灿烂弧菌实时定量 PCR 反应体系对 9 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行检测,建立质粒拷贝浓度的对数值与 C_T 值对应关系的定量标准曲线。图 5 为 pMD18-*gyrB* 重组质粒在 $2 \times 10^9 - 2 \times 10^1$ copies/μl 范围内的定量 PCR 扩增曲线,其扩增曲线反映了 PCR 的指数增长阶段和平台阶段。由熔解曲线(图 6)可知,9 个浓度梯度的扩增熔解曲线均只有 1 个熔解峰,熔解温度 T_m 为 86.6 - 87℃,表

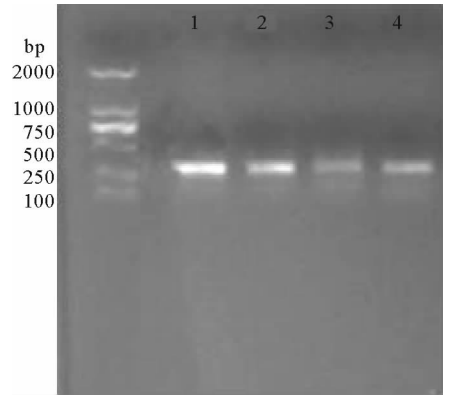


图 4 荧光定量扩增的退火温度优化
Fig. 4 Optimization of annealing temperature for the real-time PCR
M. DL2000; 1. 62℃; 2. 61℃; 3. 60℃; 4. 59℃

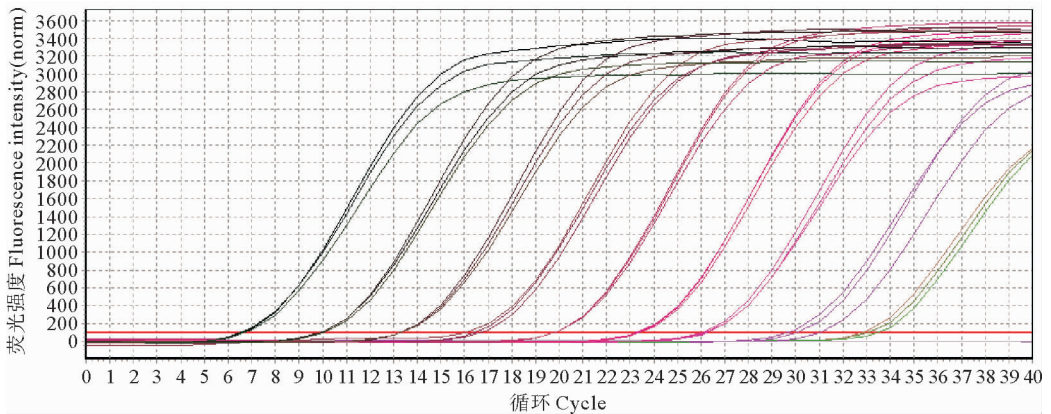


图 5 灿烂弧菌标准品的 SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增曲线
Fig. 5 Amplification curve of standard plasmid of *V. splendidus* by SYBR Green I Real-time PCR

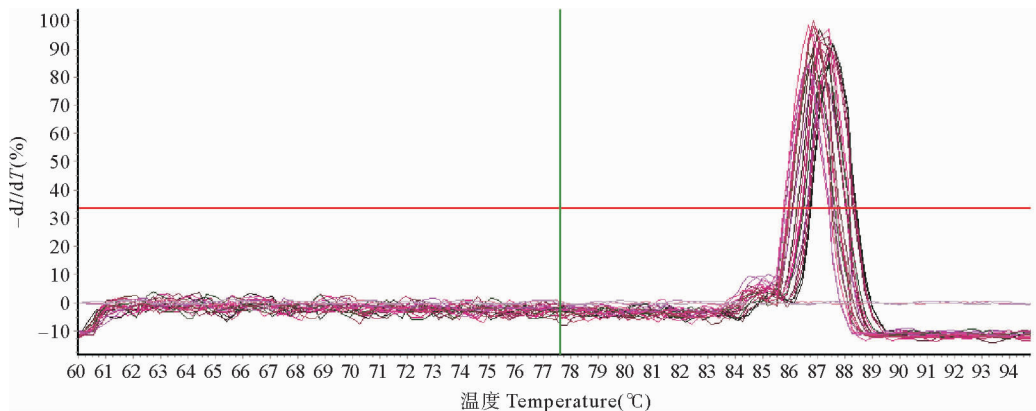


图 6 灿烂弧菌标准品的 SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增的熔解曲线
Fig. 6 Melting curve of standard plasmid of *V. splendidus* by SYBR Green I Real-time PCR

明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体。由标准曲线可以看出(图7),所制作的标准曲线在 2×10^9 - 2×10^0 拷贝数之间的 C_T 相差比较均匀,符合定量 PCR 的 C_T 值与其实拷贝数之间的线性关系。本研究所得到的标准曲线方程为 $y = -3.338x + 37.67$, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 扩增效率为 0.99。

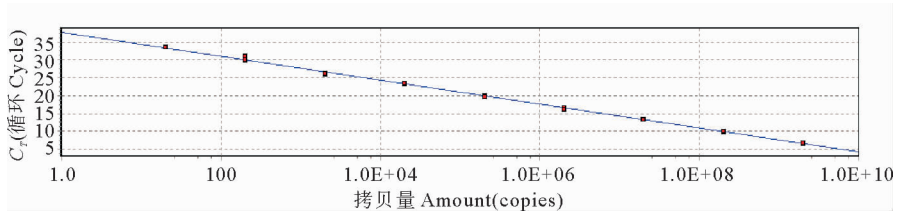


图7 灿烂弧菌标准曲线

Fig.7 The standard curve of *V. splendidus*

2.6 荧光定量 PCR 的重复性分析

组内重复性分析选取 2×10^8 - 2×10^4 copies/ μ l 的 5 个浓度梯度,每个梯度选取 3 个重复管进行组内荧光 RT-PCR 重复性分析,计算 C_T 均值、方差和变异系数(表 2)。结果表明,除了浓度为 2×10^6 、 2×10^5 copies/ μ l 的标准品中,个别 C_T 值稍有偏差外,其余标准品的 3 个重复基本一致,标准差在 0.001 - 0.453 之间,变异系数在 0.01% - 2.20% 之间。在组间重复性检测实验中(表 3),选取的 5 个标准品,除浓度为 2×10^8 copies/ μ l 的标准品 F 值大于临界值 F_{crit} ,其余 4 个浓度的标准品 F 值小于 F_{crit} ,且观测到的显著性水平 $P > 0.05$ 。表明该实时定量 PCR 有良好的重复性。

表 2 灿烂弧菌荧光定量 PCR 检测——组内重复性实验

Table 2 Intra-assay variability of Real-time PCR detection of *V. splendidus*

标准品 Standard(copies/ μ l)	组内重复均值 Average	标准差 SD	变异系数 Variation coefficient(%)
2×10^8	10.69	0.018	0.17
	10.08	0.012	0.12
	9.97	0.080	0.08
2×10^7	13.32	0.026	0.19
	13.33	0.052	0.39
	13.38	0.010	0.01
2×10^6	16.97	0.079	0.47
	16.59	0.003	0.02
	16.43	0.129	0.79
2×10^5	20.58	0.456	2.20
	19.98	0.004	0.02
	19.86	0.002	0.01
2×10^4	23.56	0.049	0.21
	23.66	0.044	0.19
	23.44	0.010	0.04

表3 灿烂弧菌荧光定量 PCR 检测——组间重复性实验

Table 3 Inter-assay variability of Real-time PCR detection of *V. splendidus*

标准品 Standard (copies/ μ l)	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i> crit
2×10^8	34.814	0.001	5.143
2×10^7	0.100	0.906	5.143
2×10^6	3.125	0.118	5.143
2×10^5	2.951	0.128	5.143
2×10^4	0.995	0.427	5.143

2.7 荧光定量 PCR 与普通 PCR 的灵敏度比较

由9个10倍梯度稀释的定量标准品重组质粒的扩增曲线可以看出, $2 \times 10^9 - 2 \times 10^1$ copies/ μ l 均有较强的荧光信号,且其扩增曲线有指数增长阶段和平台阶段,因此可以确定该检测方法可以至少检测到20个DNA拷贝数,具有较高的灵敏度。为了比较荧光定量PCR与普通PCR的灵敏度差异,取标准品($2 \times 10^9 - 2 \times 10^1$ copies/ μ l)作为普通PCR的模板,由电泳结果(图8)可知, Vs-F/Vs-R 作为灿烂弧菌的特异性引物,普通PCR能检测到 2×10^4 copies/ μ l,且在拷贝数为 2×10^4 copies/ μ l 时的条带很弱,较模糊,由此可以看出荧光定量PCR的灵敏度比常规PCR高1000倍。

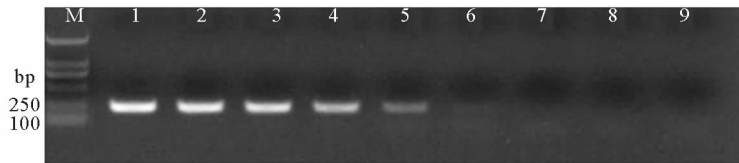


图8 普通PCR检测灿烂弧菌的灵敏度

Fig. 8 Sensitivity of *V. splendidus* detection using the conventional PCR

M. DL2000; 1. 2×10^9 ; 2. 2×10^8 ; 3. 3.2×10^7 ; 4. 4.2×10^6 ; 5. 5.2×10^5 ; 6. 6.2×10^4 ; 7. 7.2×10^3 ; 8. 8.2×10^2 ; 9. 9.2×10^1 . Unit: copies/ μ l

3 讨论

gyrB 基因普遍存在于细菌核酸中,该基因呈单拷贝,比16S rDNA的进化速度快,而且包含可变区和保守区,符合用于细菌系统发育靶基因的要求,有利于细菌鉴定及快速检测(蔡潭溪等 2005;赵敏等 2007)。*gyrB* 基因既弥补了16S rDNA的高保守性,也克服了16S-23S rDNA序列高变异性和复杂性,成为细菌系统发育及分类鉴定的新力量。目前,*gyrB* 基因在细菌鉴定等方面得到广泛应用。侯晓丽等(2006)以*gyrB* 基因为靶基因,建立系统发育树用于鉴定霍乱弧菌、副溶血弧菌,并分析了两者种系的发生关系。Calhau等(2010)以*gyrB* 基因为靶基因,利用PCR与DGGE结合技术分析了气单胞菌的菌落多样性。在细菌的快速鉴定中,可以利用*gyrB* 基因设计特异性引物,达到实验目的;Luo等(2008)以*gyrB* 基因为靶基因设计溶藻弧菌的特异性引物,扩增出568 bp的产物,特异性好,没有交叉反应。

本研究构建了含有灿烂弧菌*gyrB* 基因的标准品,得到的标准曲线方程为 $y = -3.338x + 37.67$,相关系数 $R^2 = 0.999$,扩增效率为0.99。该标准曲线线性关系和扩增效率都接近1,标准品性质稳定,标准曲线重复性较好,是理想的标准曲线。针对灿烂弧菌的快速检测研究,大多是以利用传统方法或者普通PCR技术。王印庚等(2009)利用斑点杂交法检测灿烂弧菌,对其DNA最低可检测到6.25 pg。张凤萍等(2008)利用16S-23S的间隔区设计灿烂弧菌的特异引物,最低可检测到0.5 pg的DNA。汪笑宇等(2010)利用灿烂弧菌的*gyrB* 基因设计特异引物,最低能检测出 10^3 CFU/ml 的灿烂弧菌。本研究利用各浓度梯度的标准品为模板,进行普通PCR的扩增,反应中最低可检测出 10^4 拷贝的灿烂弧菌*gyrB* 基因。建立的灿烂弧菌的荧光定量PCR技术最低

可检测到20个拷贝 *gyrB* 基因。通过上述结果发现,用荧光定量技术检测灿烂弧菌灵敏度较高,目前该技术较少应用到灿烂弧菌检测,所以本研究建立的灿烂弧菌荧光定量检测技术具有独特优势。

参 考 文 献

- 王印庚,张凤萍,李胜忠,陈霞,崔玉龙. 2009. 刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌检测探针的制备及应用. 水产学报,3(1):119-125
- 王印庚,荣小军,张凤萍,王岚,廖梅杰,邹安革. 2013. 养殖刺参“腐皮综合征”致病菌——灿烂弧菌的原位杂交检测方法的建立与应用. 渔业科学进展,34(1):114-118
- 石晓路,扈庆华,张佳峰,李庆阁,王冰,林一曼,庄志雄,刘小立,张顺祥. 2006. 多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌. 中华流行病学杂志,27(12):1053-1056
- 李亚晨,包永明,吕建发,安利佳. 2004. 海洋水产动物弧菌病的生物防治. 水产科学,23(2):3-38
- 汪笑宇,周遵春,关晓燕,姜北,陈仲,董颖,杨爱馥. 2010. 仿刺参及养殖环境中溶藻弧菌和灿烂弧菌的 PCR 快速检测. 中国农业科技导报,12(3):125-130
- 张凤萍,王印庚,李胜忠,荣小军,廖梅杰,张正. 2008. 应用 PCR 方法检测刺参腐皮综合征病原——灿烂弧菌. 海洋水产研究,29(5):100-106
- 赵敏,潘劲草,叶榕,孟冬梅,汪皓秋,孙培龙. 2007. 实时荧光定量 PCR 快速鉴定短乳杆菌. 中国卫生检验杂志,17(2):209-210
- 侯晓丽,曹清毅,潘劲草,陈智. 2006. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析. 微生物学报,46(6):884-889
- 莫照兰,茅云翔,陈师勇,张振冬,徐永立,张培军. 2003. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖沼,34(2):131-141
- 黄世旺,卢亦愚,徐丹戈,方叶珍,徐昌平,包芳珍,高海明. 2006. TaqMan 荧光定量 PCR 技术快速检测霍乱弧菌方法的建立. 中国卫生检验杂志,16(8):923-924
- 彭雁忠,贾宏,邹虹,李瑜,黄君美,肖性龙,黄胜中,林镜中. 2005. 多联实时荧光 PCR 定量方法检测四种肠道细菌的研究. 中国热带医学,5(5):943-947
- 覃倚莹,吴晖,肖性龙,杨晓泉,张经纬,余以刚,李惠芳. 2008. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌. 生物工程学报,24(10):1837-1842
- 谢建军,王印庚,张正,荣小军. 2007. 养殖刺参腐皮综合征两种致病菌 Dot-ELISA 快速检测. 海洋科学,31(8):59-64
- 蔡潭溪,蒋鲁岩,黄克和. 2005. 用基于 TaqMan 探针的 Real-time PCR 技术定量检测副溶血弧菌多重 PCR. 微生物学报,45(4):638-642
- Calhau V, Tacaõ M, Morgado F and 2 others. 2010. PCR-DGGE-based methodologies to assess diversity and dynamics of *Aeromonas* communities. J Appl Microbiol 108(2):611-623
- Farto R, Montes M, Pérez MJ and 3 others. 1999. Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. J Appl Microbiol 86(5):796-804
- Gatesoupe FJ, Lambert C, Nicolas JL. 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. J Appl Microbiol 87(5):757-763
- Luo P, Hu C. 2008. *Vibrio alginolyticus gyrB* sequence analysis and *gyrB*-targeted PCR identification in environmental isolates. Dis Aquat Organ 82(3):209-216
- Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM and 2 others. 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. Appl Environ Microbiol 73(18):5840-5847
- Yamamoto S, Harayama S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl Environ Microbiol 61(3):1104-1109
- Zhou S, Hou Z, Li N and 1 other. 2007. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. J Appl Microbiol 103(5):1897-1906